

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002449

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US  
Number: 60/549,945  
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PA 1293300

# THE UNITED STATES OF AMERICA

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

**March 21, 2005**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM  
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK  
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT  
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A  
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

**APPLICATION NUMBER: 60/549,945**

**FILING DATE: March 05, 2004**

**By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



**E. BORNETT**

**Certifying Officer**

Please type a plus sign (+) inside this box →

+

## PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

MAIL STOP PROVISIONAL PATENT APPLICATION

COMMISSIONER OF PATENTS

P.O. Box 1450

ALEXANDRIA, VA 22313-1450

THIS IS A REQUEST FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT UNDER 37 C.F.R. § 1.53(c).

22154 U.S. PTO  
60/549945

## INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and Either State or Foreign Country)
Claus	FROHBERG	Kleinmachnow, Germany
Oliver	KOETTING	Berlin, Germany
Gerhard	RITTE	Postdam, Germany
Martin	STEUP	Berlin, Germany

Additional inventors are being named on page 2 attached hereto.

## TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

PLANTS WITH INCREASED ACTIVITY STRENGTH PHOSPHORYLIERENDEN ENZYMES

## CORRESPONDENCE ADDRESS

Please Direct All Correspondence To:

<input checked="" type="checkbox"/>	Customer No.	21967			
<input type="checkbox"/>	Firm Name	Hunton & Williams LLP			
Attorney of Record		Robert M. Schulman, Esq.			
Address		Intellectual Property Department			
		1900 K Street, N.W., Suite 1200			
City	Washington	State	DC	Zip Code	20006-1109
Country	U.S.A.	Telephone	202-955-1500	Facsimile	202-778-2201

## ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

<input checked="" type="checkbox"/>	Specification	Number of Pages	131	<input type="checkbox"/>	Small Entity Status Claimed As:
<input checked="" type="checkbox"/>	Drawing(s)	Number of Sheets	5	<input type="checkbox"/>	Other (specify) _____

## METHOD OF PAYMENT OF FILING FEE FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION

A check in the amount of ☒ \$ 160.00 ☐ \$ 80.00 is enclosed to cover the filing fee. The Commissioner is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to Deposit Account No. 50-0206

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge the \$ \_\_\_\_\_ filing fee or credit any overpayment to Deposit Account No. 50-0206.

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.  
☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: \_\_\_\_\_

Respectfully submitted,

By

Jeffrey T. Perez

Date

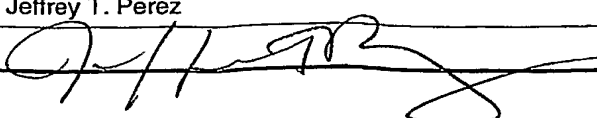
March 5, 2004

Telephone

(202) 955-1902

Registration No.

52,110

<b>FEE TRANSMITTAL</b>  <b>MAIL STOP Provisional Patent Application</b>				Complete If Known																																							
				Application No.		Not yet assigned																																					
				Filing Date		March 5, 2004																																					
				First Named Inventor		FROHBERG, et al.																																					
				Examiner Name		Not yet assigned																																					
				Group Art Unit		Unknown																																					
Total Amount Of Payment		(\$)		160		Attorney Docket No.		65084.000004																																			
METHOD OF PAYMENT (check one)						FEE CALCULATION (continued)																																					
1. <input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge indicated fees and credit any over payments to <b>Deposit Account No. 50-0206</b> in the name of Hunton & Williams LLP.						3. <b>ADDITIONAL FEES</b>																																					
						<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left;">Fee Description</th> <th style="text-align: right;">Fee Paid</th> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Notice of Appeal</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Design Issue Fee</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Plant Issue Fee</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Petition to Commissioner</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Filing Request for Reexamination</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Other (specify) _____</td> <td style="text-align: right;">\$</td> </tr> </table>						Fee Description	Fee Paid	<input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath	\$	<input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	\$	<input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time	\$	<input type="checkbox"/> Notice of Appeal	\$	<input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal	\$	<input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing	\$	<input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)	\$	<input type="checkbox"/> Design Issue Fee	\$	<input type="checkbox"/> Plant Issue Fee	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Commissioner	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)	\$	<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)	\$	<input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications	\$	<input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement	\$	<input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection	\$
Fee Description	Fee Paid																																										
<input type="checkbox"/> Surcharge - late filing fee or oath	\$																																										
<input type="checkbox"/> Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	\$																																										
<input type="checkbox"/> _____ Month Extension of Time	\$																																										
<input type="checkbox"/> Notice of Appeal	\$																																										
<input type="checkbox"/> Filing Brief in Support of Appeal	\$																																										
<input type="checkbox"/> Request for Oral Hearing	\$																																										
<input type="checkbox"/> Utility Issue Fee (or Reissue) (including Publication Fee, if necessary)	\$																																										
<input type="checkbox"/> Design Issue Fee	\$																																										
<input type="checkbox"/> Plant Issue Fee	\$																																										
<input type="checkbox"/> Petition to Commissioner	\$																																										
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unavoidable)	\$																																										
<input type="checkbox"/> Petition to Revive (Unintentional)	\$																																										
<input type="checkbox"/> Petitions Related to Provisional Applications	\$																																										
<input type="checkbox"/> Submission of Information Disclosure Statement	\$																																										
<input type="checkbox"/> Filing Submission After Final Rejection	\$																																										
<input type="checkbox"/> Recording Each Patent Assignment Per Property	\$																																										
<input type="checkbox"/> Filing Request for Reexamination	\$																																										
<input type="checkbox"/> Other (specify) _____	\$																																										
2. <input checked="" type="checkbox"/> Check Enclosed. The Commissioner for Patents is hereby authorized to charge any variance between the amount enclosed and the Patent Office charges to <b>Deposit Account No. 50-0206</b> in the name of Hunton & Williams LLP, 1900 K Street, N.W., Suite 1200, Washington, D.C. 20006-1109.						<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">FEE CALCULATION</th> </tr> <tr> <td style="width: 15%;">1. BASIC FILING FEE</td> <td style="width: 15%;"><input checked="" type="checkbox"/> Large Entity</td> <td style="width: 15%;"><input type="checkbox"/> Small Entity</td> <td style="width: 15%;"></td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: right;"><b>FEE PAID</b></td> </tr> <tr> <td>Utility Filing Fee</td> <td>\$</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Design Filing Fee</td> <td>\$</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plant Filing Fee</td> <td>\$</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Reissue Filing Fee</td> <td>\$</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Provisional Filing Fee</td> <td>\$</td> <td></td> <td style="text-align: right;"><b>160.00</b></td> </tr> </table>						FEE CALCULATION				1. BASIC FILING FEE	<input checked="" type="checkbox"/> Large Entity	<input type="checkbox"/> Small Entity		<b>FEE PAID</b>				Utility Filing Fee	\$			Design Filing Fee	\$			Plant Filing Fee	\$			Reissue Filing Fee	\$			Provisional Filing Fee	\$		<b>160.00</b>
												FEE CALCULATION																															
1. BASIC FILING FEE	<input checked="" type="checkbox"/> Large Entity	<input type="checkbox"/> Small Entity																																									
<b>FEE PAID</b>																																											
Utility Filing Fee	\$																																										
Design Filing Fee	\$																																										
Plant Filing Fee	\$																																										
Reissue Filing Fee	\$																																										
Provisional Filing Fee	\$		<b>160.00</b>																																								
2. <b>EXTRA CLAIMS FEES</b>																																											
CLAIMS AS AMENDED																																											
For	Number Present	Highest Number Paid For	Extra	Rate		Amount																																					
				Large Entity	Small Entity																																						
TOTAL CLAIMS		20	0	x \$ 18.00	x \$ 9.00	\$ 0.00																																					
INDEPENDENT CLAIMS		3	0	x \$ 86.00	x \$ 43.00	\$ 0.00																																					
MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS				\$ 290.00	\$ 145.00	\$ 0.00																																					
<b>TOTAL EXTRA CLAIMS FEES</b>						<b>\$ 0.00</b>																																					
SUBMITTED BY						Complete (if applicable)																																					
Typed or Printed Name		Jeffrey T. Perez				Registration No.		52,110																																			
Signature						Date		March 5, 2004																																			

Bayer CropScience GmbH

## **Pflanzen mit erhöhter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden**

### **5 Enzyms**

#### **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuren, codierend Stärke phosphorylierende OK1 Proteine, sowie Vektoren, Wirtszellen, Pflanzenzellen und Pflanzen enthaltend solche Nucleinsäuremoleküle. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung OK1 Proteine, die eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweisen.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch

unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten  
5 Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein  
10 Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

15

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10;  
20 Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die  
25 Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom  
30 Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat

bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B.  
5 bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls  
10 weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt  
15 beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971,  
20 Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate  
25 Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke),  
30 Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat

nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

5

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

30 Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US



6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben.

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in  
10 welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch  
15 Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten  
20 Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie neue Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren,  
25 als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

30 Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines

OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine  
5 Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu  
10 einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

15 Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

20

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer  
25 erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen  
30 gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden,

unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im  
5 Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener  
Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1  
Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1  
Proteinen in den Zellen.

10 Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung  
der Menge an OK1 Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-  
Analyse oder RT-PCR. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung  
der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch  
modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%,  
15 bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine  
Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch,  
dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an  
Transkripten, codierend ein OK1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer  
genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1  
20 Protein, aufweisen.

Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins, die eine erhöhte Aktivität  
dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann  
beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-  
25 Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune  
Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an  
OK1 Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um  
mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85%  
und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an OK1  
30 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare  
Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer  
Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10).

10

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste.

Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein OK1 Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.

Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.

30

Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-

Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuren zwei Histidine.

- Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.
- Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

- Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

- Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes

Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden  
5 Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren  
10 Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane  
15 (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

20 Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei  
25 welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht  
30 phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Scintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

5

- Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu
- 10 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt
- 15 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren
- 20 des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der
- 25 jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen
- 30 befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese,



gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimagers“ verwendet werden. Zeigt  
5 die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke  
10 vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach  
15 anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber  
20 dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose,  
25 kein signifikant erhöhtes Signal für mit  $^{33}\text{P}$  markierte alpha-1,4-Glucose aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

30 Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins

mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine  
5 nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-  
10 phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken  
15 geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1*  
20 Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke  
25 (Ansatz (B)) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die  
30 betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.

Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten (Allgemeine Methoden 8 und Beispiel 1) beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% aufweist. Bevorzugt enthält die Phosphohistidindomäne zwei Histidinreste.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung  
5 mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes  
10 Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“  
15 Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins.

20 Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt  
25 oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

30 Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere  
5 Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein aus  
10 *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.

15

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten,  
20 die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V;  
25 Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium*  
30 Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May

- et al., *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48;
- 5 Vasil et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128,
- 10 EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc et al., *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726).
- Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al.,
- 15 *Nature* 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, *Plant Journal* 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

- Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins genetisch
- 20 modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze
- 25 integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr
- 30 Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen

- oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von
- 5 Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.
- Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die
- 10 erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle
- 15 auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der
- 20 Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.
- 25 Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen
- 30 Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

5

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 10 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 15 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der  
20 codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 25 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 60% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), d), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 30 i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und



- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

- 5 Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

- Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können
- 10 z.B. biologische Aktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität;
- 15 pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc..

- Das von der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* beträgt ca. 131 kDa und das von der unter SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Oryza sativa* beträgt ca. 132 kDa. Das von
- 20 der codierenden Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht eines erfindungsgemäßen Proteins liegt daher vorzugsweise im Bereich von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa.

- Die in SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenzen codierend OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa* enthalten jeweils
- 25 eine Phosphohistidindomäne. Bevorzugt enthält daher ein erfindungsgemäßes OK 1 Protein eine Phosphohistidindomäne, welche zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Phosphohistidindomäne eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere
- 30 bevorzugt von mindesten 90% aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der erfindungsgemäßen enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, wobei das codierte OK1 Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von  
5 mindestens 95% zu den unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenzen aufweist.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein  
10 OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurden nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein  
15 OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die  
20 Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet  
25 werden kann, aufweist.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die  
30 codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID

NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine  
5 Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.  
Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus  
10 Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von  
15 (degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur  
20 Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta  
25 searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind,  
30 benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect

value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word

5 size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

10 Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine  
15 Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition ( 2002), ISBN: 0471250929)  
20 beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1%  
SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml  
25 tRNA; oder  
25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

T=65 bis 68°C  
Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS  
30 Washtemperatur: T=65 bis 68°C.

- Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie
- 5 *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa*. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der
- 10 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition ( 2002), ISBN: 0471250929) oder durch
- 15 Amplifikation mittels PCR.
- Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische
- 20 Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der
- 25 Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben,
- 30 erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach

den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa* oder *Arabidopsis thaliana* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

15

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

20 Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen  
25 Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der  
30 Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und

Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; 5 ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 10 die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 15 die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

20 Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel 25 um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner 30 kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-

Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.

- 5 Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten,
- 10 Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.
- 15 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden
- 20 oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 25 a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
- b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (Transposon activation tagging);
- 30 c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen.



d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.

5

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter

10 Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

15 Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels

20 Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA)

25 von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und

30 damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.

Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA) zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").

5

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-  
10 Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthese-Enhancers.

Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-  
15 Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt.

Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-  
20 Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die  
25 Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

30 Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen

insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

- Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.
- Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

- Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen.

Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

- Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden  
5 Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der  
Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987,  
Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-  
93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000,  
Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU  
10 et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete  
Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das  
erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens  
aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.
- 15 Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße  
Pflanzen mittels der so genannten "*in situ*-Aktivierung", hergestellt werden. Die  
eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der  
regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene, was zu einer verstärkten  
Expression von OK1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1  
20 Gens durch „*in vivo*“ Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen  
eines endogenen OK1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-  
Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte Mutation in  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer  
erhöhten Expression eines OK1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1  
25 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem  
Promotor oder einer „enhancer“-Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene in  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem  
Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-  
Pflanzen nicht exprimiert werden.
- 30 Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung  
ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein,

vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

Bei der so genannten "in vivo-Mutagenese" wird durch Transformation von  
5 Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in  
Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International  
Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A.  
Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic  
10 Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-  
447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25,  
(1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et  
al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer  
Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur  
15 Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens eine Mutation auf oder enthält  
eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und  
des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann  
die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder  
20 heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt  
zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden  
Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind  
25 daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und  
erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen  
und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich  
30 zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen  
bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat bzw. der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke  
5 besser geeignet ist.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von  
10 bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel  
15 an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen  
20 und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyppflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden  
25 Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte

Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden  
5 Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines  
Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt  
an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
10 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die  
ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich  
zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei  
Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem  
Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat  
15 aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-  
Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im  
Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat  
20 verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position  
gebundene Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu der Summe aus dem in C-3-  
Position und in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-  
Position) des betreffenden alpha-1,4-Glucans beiträgt.

25 Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden  
beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185)  
beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet  
werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat  
mittels <sup>31</sup>P-NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73,  
30 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

- 5 Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

10

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine Stärke speichernde Pflanze.

- 15 Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

- 20 Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

- 25 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

- 30 Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu



kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders bevorzugt *Zea mays*.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung  
5 erfindungsgemäße stärkespeichernde Pflanzen der (systematischen) Familie Poaceae. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

10

Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst  
15 beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare  
20 Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer  
25 erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- 30 c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.

Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt

Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann  
5 bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, edt. by R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über  
10 Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erhalten werden, die  
15 genetische Modifikation, die in Schritt a) eingeführte wurde, aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines erfindungsgemäßen fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein  
20 oder die Expression besagten fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins in der Zelle führt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in  
25 das Genom der Pflanzenzelle, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung  
30 von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist das  
5 fremde Nukleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGE oder der Insertion in  
10 Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine  
15 Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- 20 f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b),  
25 e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- 30 j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nukleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) T-DNA Molekülen, die durch Integration ins pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
- b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration ins pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (Transposon activation tagging);
- 10 c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten (initiiieren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen;
- d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem  
15 endogenen OK 1 Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Gens bewirkt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine  
20 modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt  
25 an Stärkrophosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein  
30 verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem

Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren  
5 erhältlichen Pflanzen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine  
erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke  
10 synthetisieren.

Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßer Stärken  
verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften.  
Erfindungsgemäße Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat  
einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der  
15 Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist  
insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die  
Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches  
mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen,  
beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B.  
20 Tinte, Druckfarben etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus  
erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren  
25 Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung  
erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärke-speichernden Pflanzen, bevorzugt  
aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie Poaceae, besonders  
30 bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen..

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus  
5 erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt  
10 der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben,  
15 z. B. in Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und  
20 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von  
25 Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das so genannte "wet milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der  
30 vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile

sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

- 5 Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

- Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem erntebaren Pflanzenteilen, 15 erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

- Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand 20 der vorliegenden Erfindung.

- Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im 25 Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, dass sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen Gruppen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

- 5 Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

- 10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

- In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um  
15 Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

- In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um  
20 vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

- In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen  
30 Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.



Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur  
5 ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur  
10 Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15

Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen  
20 und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen, die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließend Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein  
25 wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht  
30 genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher

veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, aus Stärke
- 10 speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der
- 15 (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

- Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden.
- 20 Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

- Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke, die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung
- 25 aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verfahren zur
- 30 Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen

Pflanzen, erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßem erntebarem Material.

5 Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung  
10 erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Teile der Pflanze verstanden werden, die als Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von  
15 Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten, Samen oder Körner.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßen  
20 Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen.

Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials  
25 wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B. aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine  
30 Przessierung im Sinne der vorleigenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinnne der vorleigendenm Erfindung dar.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des Mahlgutes.

- 5 Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B. verschiedene Typenmehle herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen  
10 Pflanzen zur Herstellung von Mehlen.

Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen  
15 bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu stellen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch Nucleinsäuremoleküle, codierend für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins, ausgewählt aus der  
20 Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in  
25 Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine  
30 Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid DSM pMI50 codiert wird;

- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 5 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- i) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 10 h) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.
- 15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können grundsätzlich aus jeder Pflanze stammen, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Kartoffel-, Gerste-, Sorghum-, Gerste-, Weizen oder Reispflanzen, besonders bevorzugt aus *Arabidopsis*- oder Reispflanzen, insbesondere besonders bevorzugt aus *Oryza sativa*.

20

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle von mindestens 21, vorzugsweise mehr als 50 und besonders bevorzugt mehr als 200 Nucleotiden Länge, die spezifisch mit mindestens einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Spezifisch hybridisieren bedeutet hierbei, dass diese Moleküle mit Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren, jedoch nicht mit Nucleinsäuremolekülen, die andere Proteine codieren. Insbesondere betrifft die Erfindung solche Nucleinsäuremoleküle, die mit Transkripten von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren und dadurch deren Translation verhindern können. Solche Nucleinsäuremoleküle, die spezifisch mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können

25

30

beispielsweise Bestandteile von antisense-, RNAi-, Cosuppressions-Konstrukten oder Ribozymen sein oder können als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Nucleinsäuremoleküle enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül.

- Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches
- 10 neben erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen zusätzliche Sequenzen enthält, welche natürlicherweise nicht in einer Kombination vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuren vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale,
- 15 Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, in welchen Speicherstärke synthetisiert wird. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die
- 20 Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition ( 2002),ISBN:
- 25 0471250929).

- Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige
- 30 Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation  
5 bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-Orientierung vorliegen.

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in *Methods in Enzymology* 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544).  
10

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen  
20 abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden,  
25 sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder  
30 Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem

erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der

5 Wirtszelle integriert vorliegen.

Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

10

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom

15 Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus stärke-speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt

20 Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere besondere bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor.

25 Bevorzugt sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Wirtszelle. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

30

Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen,



bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und  
5 einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft  
10 Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen neben erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, Pflanzenzellen und synthetischem  
15 Kulturmedium auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von  
20 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft  
25 Zusammensetzungen, die zur Identifizierung erfindungsgemäßer Nucleinsäuren verwendet werden. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen neben einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül, erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül oder erfindungsgemäßen Vektor weitere Nucleinsäuremoleküle, insbesondere Nucleinsäuremoleküle pflanzlichen Ursprungs,  
30 die in Form von genomischer DNA, mRNA oder als als Klone in sogenannten DNA-Bibliotheken vorliegen können. Bevorzugt sind DNA-Bibliotheken, welche als Cosmide, Phagmide, Plasmide, YACs oder BACs vorliegen. Die DNA-Bibliotheken

können sowohl genomische, als auch cDNA enthalten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle oder einen erfindungsgemäßen Vektoren werden in diesen Zusammensetzungen bevorzugt als Hybridisierungsprobe eingesetzt.

5

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Protein, welches eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt. Bevorzugt handelt es sich dabei um ein Protein, welches eine phosphorylierte-Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte-

10 Stärke als Substrat benötigt.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt und einen Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-alpha-Stärke überträgt.

15 Bevorzugt überträgt ein erfindungsgemäßes Protein den beta-Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-Stärke. Besonders bevorzugt überträgt ein erfindungsgemäßes Protein den beta-Phosphatrest des ATP auf phosphorylierte-Stärke und den gamma-Phosphatrest von ATP auf Wasser und besitzt daher die Aktivität einer [phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. [phosphorylierte-Stärke]-

20 Wasser-Dikinase.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches bei der Übertragung eines Phosphatrestes auf phosphorylierte-Stärke als phosphoryliertes Zwischenprodukt anfällt.

25

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches eine erhöhte Bindungsaktivität zu phosphorylierter-Stärke, im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist.

30 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu

Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle einer phosphorylierten-Stärke einführt.

- Vorzugsweise werden von einem erfindungsgemäßen Protein mindestens 30%, bevorzugt mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 90% und
- 5 insbesondere bevorzugt mindestens 120% mehr Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle einer phosphorylierten-Stärke im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle einer phosphorylierten-Stärke eingeführt.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

- 15 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches eine Phosphohistidindomäne aufweist. Bevorzugt enthält die Phosphohistidindomäne zwei Histidinreste.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind erfindungsgemäße
- 20 Proteine, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Proteinen, die die unter SEQ ID NO 2. oder SEQ ID NO 4 angegebene Aminosäuresequenz umfassen;
- b) Proteinen, die durch die codierende Region der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 inserierten DNA codiert werden; oder
- 25 c) Proteinen, die zu der Aminosäuresequenz der unter a) oder b) genannten Proteine eine Identität von mindestens 60% aufweisen.

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Proteine mit phosphorylierter-Stärke phosphorylierender Aktivität, wobei das codierte Protein eine
- 30 Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz oder zu der von der Insertion

in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 codierten Aminosäuresequenz eines OK1 Proteins aufweist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein  
5 erfindungsgemäßes Protein, dadurch charakterisiert, dass die das Protein  
codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne aufweist.  
Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Protein eine Phosphohistidindomäne  
auf, die zu der in SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz eine Identität von  
mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens  
10 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt  
von mindestens 90% auf.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein  
erfindungsgemäßes Protein, wobei das Protein aus einer *Arabidopsis*- oder einer  
15 Reispflanze stammt.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Protein,  
welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Stärke, im Vergleich  
zu nicht-phosphorylierter- Stärke aufweist, worin die Bindungsaktivität zu P-Stärke  
20 mindestens 3-fach, bevorzugt mindestens 4-fach, besonders bevorzugt mindestens  
5-fach und insbesondere bevorzugt mindestens 6-fach erhöht ist im Vergleich zur  
Bindungsaktivität zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform auch Proteine, die durch  
25 erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle codiert werden.

### **Beschreibung der Sequenzen**

SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des A.t.-  
30 OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren A.t.-OK1-  
pGEM und OK1-pDEST17 und inseriert.

SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des  
5 O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.

SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1  
10 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*.

### Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu  
15 phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3*  
20 Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

25

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen  
30 Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2:

Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. ). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit  $^{33}\text{P}$  markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend

auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch  
5 dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen  
10 Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

15 Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP oder  
20 randomisiertes  $^{33}\text{P}$  ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

25

## Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der  
30 erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt,

dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

## 5 1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Gewebe

### a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

### b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

### c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten



Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben,  
5 bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254).

10

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
	1 mM	EDTA
	2 mM	Dithioerythritol (DTE)
15	2 mM	Benzamidin
	2 mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
	0.5 mM	PMSF
	0.02 %	Triton X-100

## 2. Isolierung von Blattstärke

20 a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für  
25 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100  $\mu$ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

30 Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials

- mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ ) gegeben. Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-  
5 Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).
- c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine
- 10 Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei ein Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom  
15 betreffenden Waschpuffer abzutrennen.
- d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke
- Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils  
20 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.
- 25 e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke
- Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.
- 30 Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird

in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

10 f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0  
0.2 mM EDTA  
0.5 % Triton X-100

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

25 3. **Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird

zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm

eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

- 5 Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

- 10 Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

- Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend  
15 jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD<sub>600</sub>) von ca.  
20 0,8 inkubiert.

- Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels  
25 IPTG), so wird nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C)  
30 vom Kulturmedium abgetrennt werden.

#### 4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

- a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen  
Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g
- 5 Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt
- 10 wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.
- b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins
- 15 Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates wird mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend
- 20 wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polysteren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von
- 25 einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von
- 30 einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.

Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

5

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

10

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

15

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

20

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

25

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

## 5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3.

- 5 Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

## 6. Reinigung eines R1 Proteins

- 10 Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

15

## 7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

### a) *In vitro* Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

- 20 Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes
- 25 R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschrte finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschrte erfolgt eine



Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

5	R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
		1 mM	EDTA
		6 mM	MgCl <sub>2</sub>
		0,5 mM	ATP

10 Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke**

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-

15 Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit  
20 Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach  
25 Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je  
30 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer

Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

- b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen
- Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

SDS-Probenpuffer:	187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
20	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	Dithioerythritol (DTE, frisch zusetzen!)

- 25 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

**9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden**

- 30 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung

gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein  
5 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

## 10 10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

- a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke
- Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und  
15 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte  
20 Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.
- 25 Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen
- Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF  
30 analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine

bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch

5 die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI nr <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen

10 von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von

15 Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt

20 eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM

25  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril

30 zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix (ε-Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burkert Reflex<sup>TM</sup> II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte α-1,4-Glucose binden und/oder P-α-1,4-Glucose als Substrat benötigen.

#### **11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins**

- a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke
- Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschritt wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschritt werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.
- Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

- b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste
- Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf des Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) analysiert.

- c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden
- Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

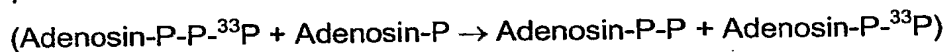
- d) Zusammensetzung verwendeter Puffer
- 25 Phosphorylierungs-Puffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5  
1 mM EDTA  
6 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,01 bis 0,5 mM ATP  
0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes <sup>33</sup>P-ATP (alternativ kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest enthält)
- 30

Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-  
5 7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

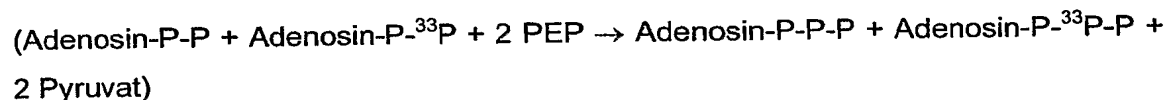
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe  
10 von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



15 2. Reaktionsschritt:



Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser  
20 Reaktion eine Mischung aus größtenteils  $\beta^{33}\text{P-ATP}$  und etwas  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$ .

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100  $\mu\text{Ci}$ , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), wird mit 2  $\mu\text{l}$   
25 Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90  $\mu\text{l}$  Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für  
30 mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

#### 10 Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

##### iv) Verwendete Puffer

15	Pyruvatkinasepuffer:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA

	Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA
20		10 %	Glycerol
		5 mM	MgCl <sub>2</sub>
		5 mM	KCl
		0,1 mM	ATP
		0,3 mM	AMP

25

#### 12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend



wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B.

- 5 Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex
- 10 Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende

15 Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
20	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
	Stop des Laufes		

- Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von
- 25 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die
- 30 Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen

Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

- 10 Eluent C: 100 mM NaOH  
Eluent D: 100 mM NaOH  
500 mM Natriumacetat

**14. Transformation von Reispflanzen**

- 15 Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

**15. Transformation von Kartoffelpflanzen**

- Kartoffelpflanzen wurden mit Hilfe von Agrobakterium, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, transferiert.

**16. Transformation von Weizenpflanzen**

- Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.

25

**17. Transformation von Maispflanzen**

- Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.

## 18. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat

### a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg  
5 Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption  
10 wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

### 15 b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit  
20 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

### 25 c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-  
30 Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Aufrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der

erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den  
5 zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

### **Beispiele**

- 10 1. **Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist**
  - a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*  
Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (Frischgewicht) von *Arabidopsis*  
15 *thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.
  - b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*  
20 Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.
  - c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von  
25 *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein  
Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und  
30 zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

- d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem

- 5    Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-

- 10    Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

- 15    In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

- 20    e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter

- 25    Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

30

- f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt.

- 5 Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html); ProFound: [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe); PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch
- 10 für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass
- 15 diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der
- 20 Datenbank vorliegt (Acc.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

## **2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert**

- Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA,
- 25 isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den
- 30 Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird

mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,

5 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

10 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

15 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1<sup>st</sup> Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

20 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

25 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C) (30 s), 68°C (

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

30 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten



- Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.
- 5 Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

### **3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins**

- 10 Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch
- 15 sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide,
- 20 die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren,
- 25 codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

#### 4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3.,  
5 Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von  
10 ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen  
15 der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

#### 5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach  
20 Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

#### 6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte  
25 nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl  
30 Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (<sup>33</sup>P) markiertes,

randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55  $\mu$ Ci) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C)

5 wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

10

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, 15  
20  
signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substrat benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substrat von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die  
5 Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

## 7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei  
10 wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch  
15 Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der  
20 Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt  
25 wurde.

In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten  
30 Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Daraus ist zu schließen, dass bei

diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

- In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des
- 5 phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im
- 10 Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem
- 15 Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem
- 20 Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.
- 25 Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.
- 30 Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die

nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

10

#### **8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke**

##### **a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke**

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils <sup>33</sup>P markiertes ATP (ca. 2,5 x 10<sup>6</sup> cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™,

BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

	Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
5	Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
	Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

- Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut
- 10 zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte
- 15 Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem
- 20 Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.
- Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa
- 25 Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H<sub>2</sub>O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den
- 30 einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
-----------------	---------------	-------------------	-----------

Ansatz B (R1):        2518 cpm/10 µl        30.216 cpm/120 µl        252 cpm/µl

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels  
5 HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen  
Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben  
zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt  
b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1):    43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A  
10 (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl  
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1):    16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B  
(entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl  
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

15 Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur  
Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den  
unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach  
Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln  
der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des  
20 erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-  
6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion  
17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml  
Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit  
Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter,  
25 BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden  
folgende Meßwerte erhalten:



	Gesamt cpm je Fraktion	
	Ansatz (OK1)	AAAnsatz (R1)
Fr 13	8,7	3,3
Fr 14	13,1	32,2
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
Fr 16	399,8	112,3
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
Fr 18	196,7	17,3
Fr 19	6,7	18,9
Summe	2581,5	2938,3
Auftrag	3000,0	3000,0
Wiederfindung	86,0%	97,9%

**Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

10

15

## 9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt.

- 5 Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ
- 10 ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-
- 15 OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

- Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein
- 20 aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

25 Os\_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os\_ok1-F6 (AAAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

- 30 Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

Os\_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os\_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120  
5 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ  
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der  
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
Os\_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os\_ok1-R7  
10 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121  
bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ  
15 DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der  
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
Os\_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os\_ok1-R4  
(GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
20 Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit  
pML119 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe  
der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide  
Os\_ok1-F3 (CATTGATCAATGGAGGATG) und Os\_ok1-R2  
25 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis  
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen  
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122  
bezeichnet.

Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte  
30 folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

- Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche  
5 der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os\_ok1-F4 (s. o.) und Os\_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os\_ok1-F6 und Os\_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
10 Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

- Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *XhoI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os\_ok1-F3 (s. o.) und Os\_ok1-R2Xho (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
15 Plasmid wurde mit pMI45 bezeichnet.

- Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

- 20 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

- 25 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflII/NotI* aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

- Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen  
30 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit

pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

#### **10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt**

- 5 Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der
- 10 Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und
- 15 die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

#### **11. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

- 20 a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1
- Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit den Primern glb1-F2
- 25 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTTAC) und X2

- 5 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

- Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels  
10 T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

- Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA  
15 Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

- pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),  
20 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

- pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-  
25 Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

- 30 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die

Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl136II* und *XhoI* geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

15

b) Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

20

c) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke  
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, isoliert aus diesen reifen Körnern, zeigten einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

30

## 12. Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

### a) Herstellung des Plasmides pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das *EcoRI*-*HindIII*-Fragment umfassend  
5 den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator  
herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBIB-Hyg ligiert  
(Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203).

Das Plasmid pBinB33 wurde erhalten, indem der Promotor des Patatin Gens B33  
aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) als *DraI*-Fragment (Nucleotide –  
10 1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der  
T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert wurde. Daraus entstand das  
Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und  
*SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR  
(Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) ligiert. Hieraus entstand  
15 der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

### b) Herstellung des Vektors A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

Die codierende Sequenz des A.t.-OK1 Proteins wurde mit den  
Restriktionsendonucleasen *Bsp120I* und *Sall* aus dem Plasmid A.t.-OK1-pGEM  
20 herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *Sall* geschnittenen Vektor pBinB33-Hyg  
ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit A.t.-OK1-pBinB33-Hyg bezeichnet.

### c) Transformation von Kartoffelpflanzen

*Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV2260) wurde mit dem Plasmid A.t.-OK1-  
25 pBinB33-Hyg transformiert. Anschließend wurden Kartoffelpflanzen der Varietät  
Désirée mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid A.t.-OK1-  
pBinB33-Hyg nach der bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29)  
beschriebenen Methode transformiert und Pflanzen regeneriert.

### 30 d) Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke



Es konnten mittels Northern Blot Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.

Eine Western Blot Analyse, welche mit dem unter Beispiel 10 beschriebenen Antikörpers durchgeführt wurde, bestätigte, dass Pflanzen, bei welchen mRNA des  
5 heterolog exprimierten OK1 Proteins nachzuweisen war, auch eine erhöhte Menge an OK1 Protein aufwiesen, im Vergleich zu nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen. Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Menge an OK1 Protein und eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Stärke, die aus Knollen  
10 dieser Pflanzen isoliert wurde, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphat.

### **13. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

#### **15 a) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1**

Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonucleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACAAGCTTAATTAAGAT  
ATCATTTAC) und X2  
20 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein  
25 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet. pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären  
30 Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),

19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al.,

- 5 Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and  
10 Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

- Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*  
15 (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

- Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (EMBL Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) wurde als *Pst*I-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.  
20

- Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sac*I nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *Sma*I und *Sac*I geschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.  
25

- Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein  
30 aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Asp*718I geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *Sda*I nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große

Fragment wurde in das mit *EcoRV* und *PstI* geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

b) Transformation von Maispflanzen

- 5 Maispflanzen wurden mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1 mittels der unter Allgemeine Methoden, Punkt 17 beschriebenen Methode transformiert.

c) Analyse der transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke  
Es konnten mittels Northern Blot Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine

- 10 Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.

Maispflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, isoliert aus den Körnern, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke  
15 gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

**14. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

- 20 a) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen  
pMCS5 (Mobitec, [www.mobitec.de](http://www.mobitec.de)) wurde mit *BglII* und *BamHI* verdaut und religiert.  
Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.

Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9  
25 (ACTTCTgCAgCggCCgCgATCgTTCAAACATTTggCAATAAAgTTTC) und P10  
(TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAgATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)  
amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *HindIII* und *PstI* verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-nos bezeichnet. In diesen Vektor  
30 wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant

Mol. Biol. 18: 675-689) und das durch Verdau mit *ClaI* und Religation verkürzte erste Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet.

In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit

- 5 *Bsp120/NotI* aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in sense Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais,

- 10 das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

b) Transformation von Weizenpflanzen

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem aus einem Agarosegel gereinigten Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, und dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach der bei

- 20 Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.

c) Analyse der Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus, reifen Körnern der aus der Transformation erhaltenen T0 Pflanzen wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt der Stärke, die aus einzelnen Körnern isoliert wurde, war deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen isoliert wurde.

25

## Patentansprüche

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine modifizierte Stärke synthetisiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 5, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
7. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Pflanze nach Anspruch 7, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
9. Pflanze nach Anspruch 8, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
10. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
11. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

12. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, worin
  - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der (enzymatischen) Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
  - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
  - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
13. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
14. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
15. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8, oder 9.
16. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
17. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 13 oder erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 14, 15 oder 16 derivatisiert wird.
18. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
19. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 17.
20. Verwendung von modifizierter Stärke nach Anspruch 13 oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 14, 15 oder 16 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.

21. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 13.
22. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
23. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder erntebarem Material nach Anspruch 11.
24. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 zur Herstellung von Mehlen.
25. Nucleinsäuremolekül codierend ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
  - b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweist;
  - c) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID No. 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine zu diesen Sequenzen komplementäre Sequenz umfassen;
  - d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder c) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 60% aufweisen;
  - e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), oder c) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
  - f) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und

- g) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e) oder f) genannten Nucleinsäuremolekülen darstellen.
26. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es ein OK1 Protein aus *Arabidopsis* oder ein OK1 Protein aus Reis codiert.
27. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25 oder 26.
28. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25, 26 oder 27.
29. Vektor nach Anspruch 28, wobei das Nucleinsäuremolekül mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
30. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25 oder 26, einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 27 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 28 oder 29.
31. Zusammensetzung enthaltend Nucleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 25 oder 26, ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 27 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 28 oder 29.
32. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 31 zur Identifizierung von Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen.
33. Protein, welches eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte Stärke als Substrat benötigt.
34. Protein, welches phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt und einen Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-Stärke überträgt.



1 / 5

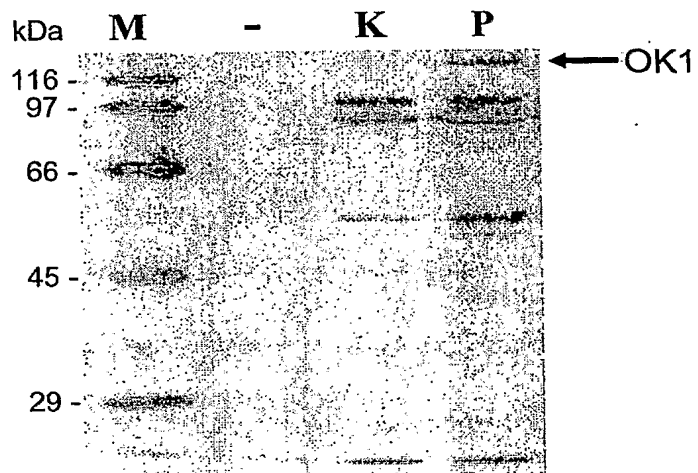


Fig. 1

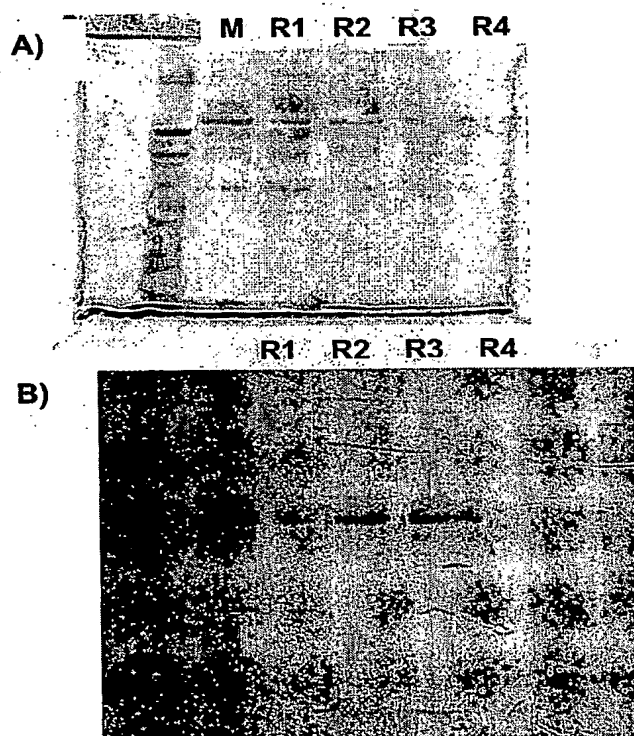


Fig. 2

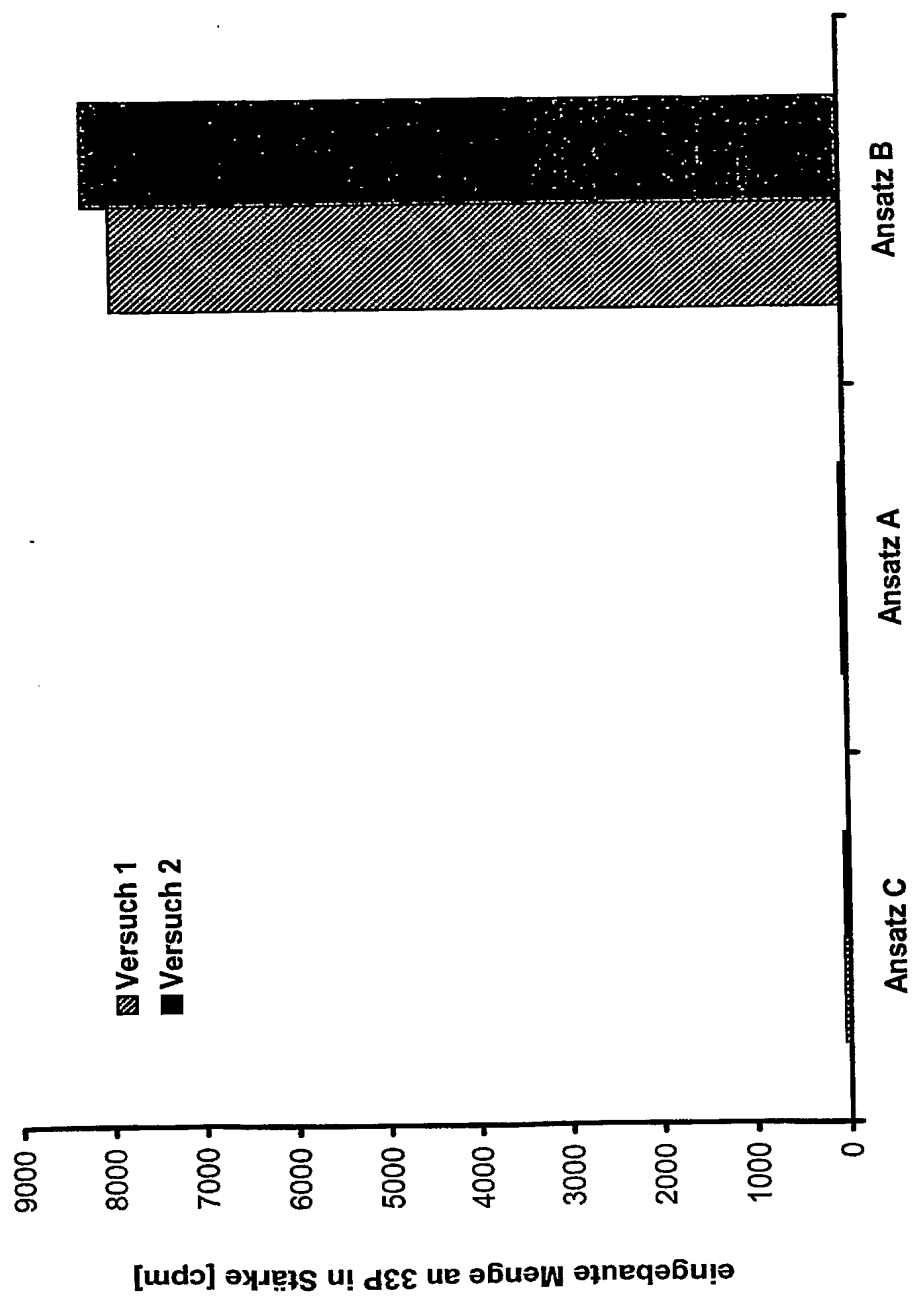


Fig.: 3

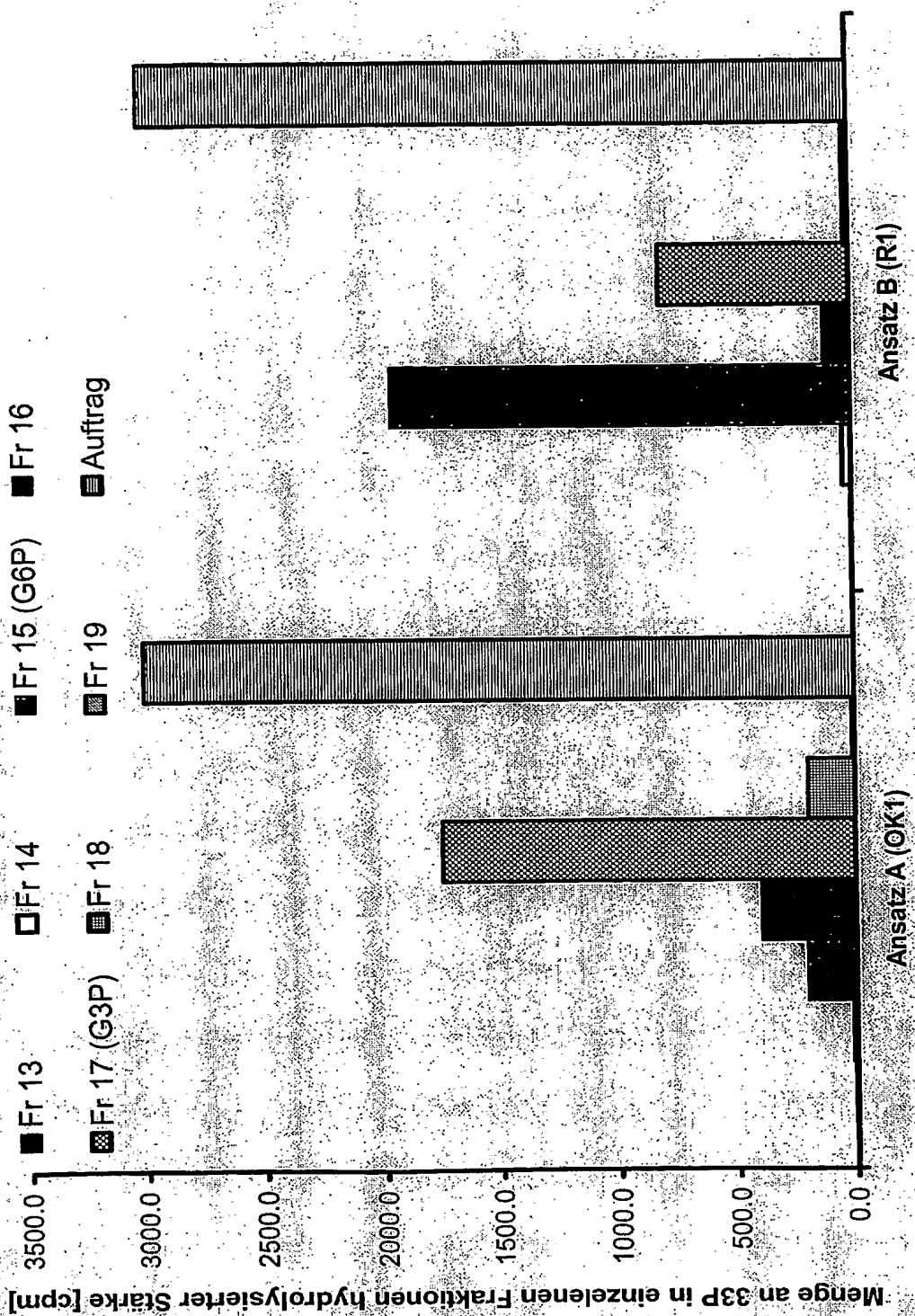


Fig. 4

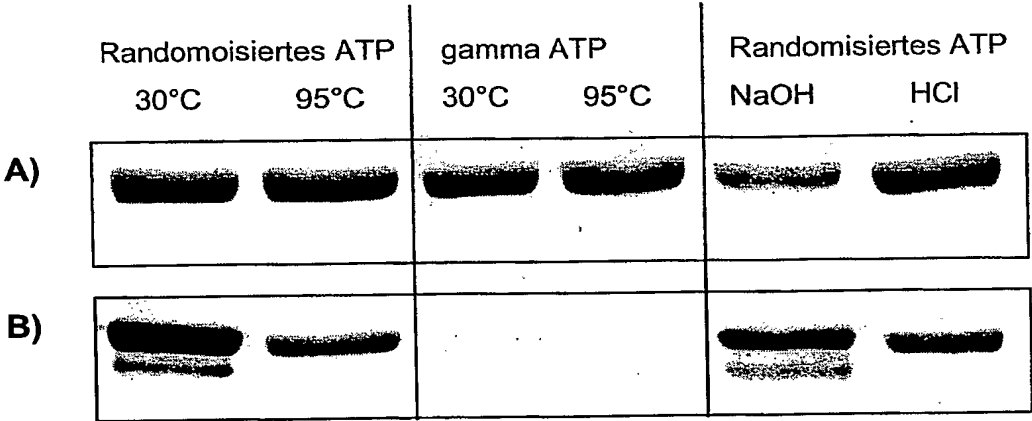


Fig. 5

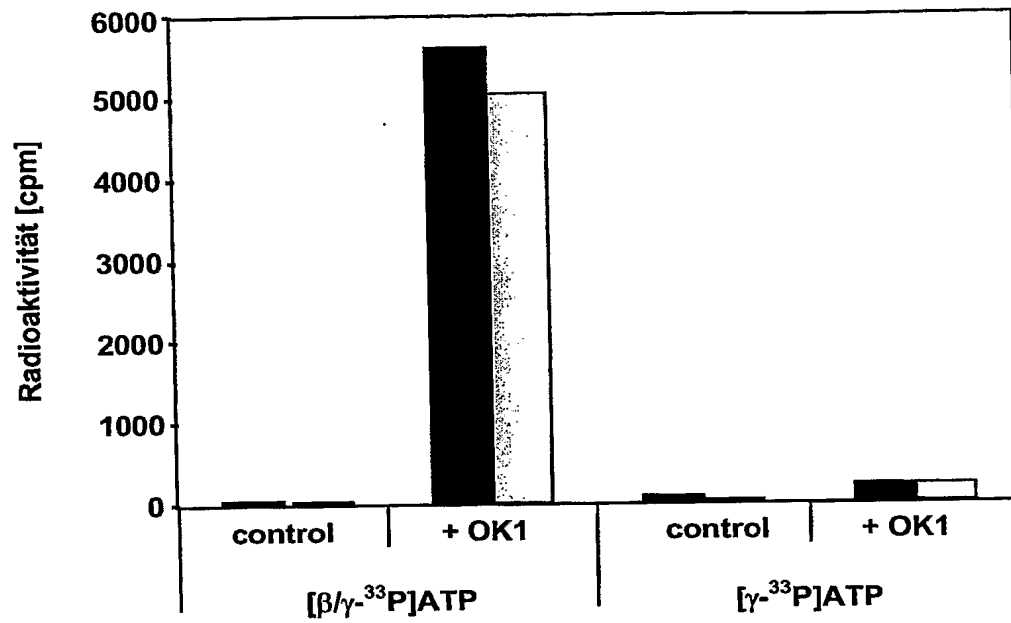


Fig. 6

# SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen mit erhöhter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

<130> BCS 04-5002-EP

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1

atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	

act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	

aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	

cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	

aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	

gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	
85 90 95	

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag	336
Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu	
100 105 110	

aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag	384
Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu	
115 120 125	

tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct	432
---	-----

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser	
130 135 140	
ggt gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt	480
Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val	
145 150 155 160	
ggt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag	528
Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu	
165 170 175	
ggt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat	576
Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn	
180 185 190	
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag	624
His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln	
195 200 205	
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc	672
Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser	
210 215 220	
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg	720
Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp	
225 230 235 240	
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat	768
Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp	
245 250 255	
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt	816
Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val	
260 265 270	
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac	864
Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr	
275 280 285	
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt	912
Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe	
290 295 300	
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga	960
Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg	
305 310 315 320	
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act	1008
Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr	
325 330 335	
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct	1056
Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser	
340 345 350	
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac	1104
Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp	

355	360	365	
ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag	caa gaa atc aag	1152	
Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys			
370	375 380		
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta		1200	
His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu			
385	390 395 400		
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa		1248	
Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys			
405	410 415		
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt		1296	
Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu			
420	425 430		
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg		1344	
Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met			
435	440 445		
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt		1392	
Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe			
450	455 460		
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg		1440	
Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu			
465	470 475 480		
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att		1488	
Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile			
485	490 495		
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc		1536	
Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala			
500	505 510		
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac		1584	
Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp			
515	520 525		
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg		1632	
Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met			
530	535 540		
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc		1680	
Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala			
545	550 555 560		
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta		1728	
Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val			
565	570 575		
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa		1776	
Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu			
580	585 590		



ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605	1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620	1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635	1920
cct cct aat gtg gag att tta gga aaa gct cta gga att cca gag aat Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn 645 650 655	1968
agt gtc aag acc tat aca gaa gca gag att cgt gct gga att att ttc Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe 660 665 670	2016
cag atc tca aag ctc tgc act gtt ctt cta aaa gct gta aga aat tca Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser 675 680 685	2064
ctt ggt tct gag ggc tgg gat gtc gtt gta cct gga tcg acg tct ggg Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly 690 695 700	2112
aca tta gtt cag gtt gag agc att gtt ccg gga tca ttg cca gca act Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr 705 710 715 720	2160
tct ggt ggt cct att att ctc ttg gtc aat aaa gct gat ggc gat gaa Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu 725 730 735	2208
gag gta agt gct gct aat ggg aac ata gct gga gtc atg ctt ctg cag Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln 740 745 750	2256
gag ctg cct cac ttg tct cac ctt ggc gtt aga gcg cgg cag gag aaa Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys 755 760 765	2304
att gtc ttt gtg aca tgt gat gat gat gac aag gtt gct gat ata cga Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg 770 775 780	2352
cga ctt gtg gga aaa ttt gtg agg ttg gaa gca tct cca agt cat gtg Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val 785 790 795 800	2400
aat ctg ata ctt tca act gag ggt agg agt cgc act tcc aaa tcc agt Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser 805 810 815	2448

gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp 820 825 830	2496
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser 835 840 845	2544
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly 850 855 860	2592
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser 865 870 875 880	2640
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val 885 890 895	2688
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val 900 905 910	2736
gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser 915 920 925	2784
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro 930 935 940	2832
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met 945 950 955 960	2880
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala 965 970 975	2928
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu 980 985 990	2976
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn 995 1000 1005	3024
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln 1010 1015 1020	3069
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg 1025 1030 1035	3114
gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt	3159

Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val	
	1040					1045					1050				
caa	gaa	atg	ctt	tcg	cgc	gac	tta	tca	ttc	gtt	ctg	cac	aca	gtg	3204
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val	
	1055					1060					1065				
agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct	3249
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala	
	1070					1075					1080				
cct	ggg	tta	ggg	gag	act	tta	gct	tca	gga	aca	aga	gga	aca	cca	3294
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro	
	1085					1090					1095				
tgg	aga	ctc	gct	tcg	ggg	aag	ctc	gac	ggg	att	gta	caa	acc	tta	3339
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	
	1100					1105					1110				
gct	ttc	gca	aac	ttc	agc	gaa	gag	ctt	ctt	gtg	tca	gga	aca	ggg	3384
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly	
	1115					1120					1125				
cct	gct	gat	gga	aaa	tac	gtt	cgg	ttg	acc	gtg	gac	tat	agc	aaa	3429
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys	
	1130					1135					1140				
aaa	cgt	tta	act	gtt	gac	tcg	gtg	ttt	aga	cag	cag	ctc	ggg	cag	3474
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	
	1145					1150					1155				
aga	ctc	ggg	tcg	gtt	ggg	ttc	ttc	ttg	gaa	aga	aac	ttt	ggc	tgt	3519
Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Gly	Cys	
	1160					1165					1170				
gct	caa	gac	gtt	gaa	ggg	tgt	ttg	gtt	ggg	gaa	gat	gtt	tac	att	3564
Ala	Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Asp	Val	Tyr	Ile	
	1175					1180					1185				
gtt	cag	tca	agg	cca	caa	cct	ctg	tag							3591
Val	Gln	Ser	Arg	Pro	Gln	Pro	Leu								
	1190					1195									

```
<210> 2
<211> 1196
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana
```

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile  
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His  
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser  
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg  
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu  
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala  
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu  
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu  
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser  
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val  
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu  
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn  
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln  
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser  
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp  
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp  
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val  
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr  
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe  
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg  
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr  
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser  
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp  
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys  
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu  
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys  
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu  
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met  
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe  
450 455 460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu  
465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile.  
485 490 495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala  
500 505 510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp  
515 520 525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met  
530 535 540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala  
545 550 555 560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val  
565 570 575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu  
580 585 590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu  
595 600 605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg  
610 615 620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe  
625 630 635 640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn  
645 650 655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe  
660 665 670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser  
675 680 685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly  
690 695 700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr

705

710

715

720

Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu  
 725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln  
 740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys  
 755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg  
 770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val  
 785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser  
 805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp  
 820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser  
 835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly  
 850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser  
 865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val  
 885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val  
 900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser  
 915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro  
 930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met  
945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala  
965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu  
980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn  
995 1000 1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln  
1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg  
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val  
1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val  
1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala  
1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro  
1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu  
1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly  
1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys  
1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln  
1145 1150 1155



Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys  
 1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
 1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
 1190 1195

<210> 3  
 <211> 3644  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(3633)  
 <223>

<400> 3  
 cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata 51  
 Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile  
 1 5 10

ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt 99  
 Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly  
 15 20 25

gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc 147  
 Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg  
 30 35 40 45

ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca 195  
 Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr  
 50 55 60

aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc 243  
 Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu  
 65 70 75

cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att 291  
 Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile  
 80 85 90

atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg 339  
 Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu  
 95 100 105

gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa 387  
 Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu  
 110 115 120 125

aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp 130 135 140	435
aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp 145 150 155	483
ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu 160 165 170	531
gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys 175 180 185	579
aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys 190 195 200 205	627
gtt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala 210 215 220	675
gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe 225 230 235	723
atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat Met Arg Ser Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp 240 245 250	771
aca act ggg ctt gat gga ata gca ctg aaa ctg gtg gag ggc gat aaa Thr Thr Gly Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys 255 260 265	819
gca tcc agg aac tgg tgg cgg aag tta gag gtt gtt cgc ggg ata ttg Ala Ser Arg Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu 270 275 280 285	867
tca gaa tct ttt gat gac cag agt cgt ctg ggg gcc ctt gta tac tca Ser Glu Ser Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser 290 295 300	915
gct att tat ctg aag tgg att tat aca ggt cag ata tcg tgc ttt gaa Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu 305 310 315	963
gat ggt ggc cac cat cgg cct aac aaa cat gct gag ata tcg agg caa Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln 320 325 330	1011
ata ttc cgt gaa ctt gaa atg atg tat tat ggg aaa acc aca tca gcc Ile Phe Arg Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala 335 340 345	1059
aag gat gtt ctc gtg att cgc aaa att cat ccc ttt tta cct tca ttt	1107

Lys Asp Val Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe	
350 355 360 365	
aag tca gag ttt aca gcc tct gtc cct cta aca cga att cgt gat att	1155
Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile	
370 375 380	
gct cac cgg aat gac atc cca cat gat ctc aag caa gaa atc aag cat	1203
Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His	
385 390 395	
act ata caa aac aaa ctt cat cgt aat gct gga cct gag gat ctt att	1251
Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile	
400 405 410	
gct aca gaa gtc atg ctt gct agg att act aag acc cct gga gaa tac	1299
Ala Thr Glu Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr	
415 420 425	
agt gaa aca ttt gtt gaa caa ttc acg ata ttt tat agc gaa cta aaa	1347
Ser Glu Thr Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys	
430 435 440 445	
gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ttt gag caa ctg gag tcc atc aag	1395
Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys	
450 455 460	
gaa tct ctg aac gag tca ggc tta gaa gtt ctc tca tcc ttt gtg gaa	1443
Glu Ser Leu Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu	
465 470 475	
acc aaa agg agt ttg gac caa gtg gat cat gca gaa gat ttg gat aaa	1491
Thr Lys Arg Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys	
480 485 490	
aat gat acc att caa att ttg atg act acc ttg caa tca tta tct tct	1539
Asn Asp Thr Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser	
495 500 505	
cta aga tcg gtt cta atg aag ggc ctt gaa agt ggc ctt aga aat gat	1587
Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp	
510 515 520 525	
gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa	1635
Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu	
530 535 540	
att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat	1683
Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn	
545 550 555	
act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct	1731
Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala	
560 565 570	
aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc	1779
Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly	

575	580	585	
atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala 590 595 600 605			1827
ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser 610 615 620			1875
gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala 625 630 635			1923
aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu 640 645 650			1971
ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly 655 660 665			2019
ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala 670 675 680 685			2067
ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala 690 695 700			2115
att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly 705 710 715			2163
gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser 720 725 730			2211
tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala 735 740 745			2259
gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val 750 755 760 765			2307
att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala 770 775 780			2355
cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt Arg Gln Glu Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val 785 790 795			2403
aca gat gtg tat ttg ctt gag gga aaa tat atc aga tta gaa gca tca Thr Asp Val Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser 800 805 810			2451

tcc atc aat gtc aat ctc tca ata gtt tca gaa aaa aat gac aat gct Ser Ile Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala 815 820 825	2499
gtc tct aca gaa cca aat agt aca ggg aat cca ttt caa cag aaa ctc Val Ser Thr Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu 830 835 840 845	2547
caa aat gaa ttc tct cta cca tcg gat atc gag atg cca ctg caa atg Gln Asn Glu Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met 850 855 860	2595
tct aag caa aaa agc aaa tca gga gtg aat ggt agt ttt gct gct ctt Ser Lys Gln Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu 865 870 875	2643
gag ctt tca gaa gct tca gtg gaa tca gct ggt gca aaa gct gct gca Glu Leu Ser Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala 880 885 890	2691
tgc aga act ctt tct gtt ctt gct tca ttg tct aat aaa gtc tat agt Cys Arg Thr Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser 895 900 905	2739
gat caa gga gtt cca gca gcc ttt aga gtc cct tct ggt gct gtg ata Asp Gln Gly Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile 910 915 920 925	2787
cca ttt gga tca atg gag gat gcg ctc aag aaa agt gga tca ctg gaa Pro Phe Gly Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu 930 935 940	2835
tcc ttt aca agc ctt cta gaa aag att gaa aca gcc aaa gtc gaa aat Ser Phe Thr Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn 945 950 955	2883
ggt gaa gtt gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His 960 965 970	2931
ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro 975 980 985	2979
cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu 990 995 1000 1005	3027
gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val 1010 1015 1020	3072
agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val 1025 1030 1035	3117

tgg gct tct tta tac	aca agg aga gcc atc	cta agc cgt cga gcc	3162
Trp Ala Ser Leu Tyr	Thr Arg Arg Ala Ile	Leu Ser Arg Arg Ala	
1040	1045	1050	
gct ggt gtt tat cag	aga gac gcg aca atg	gct gtt ctt gtc caa	3207
Ala Gly Val Tyr Gln	Arg Asp Ala Thr Met	Ala Val Leu Val Gln	
1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc	3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys	
1070	1075	1080	
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct	3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro	
1085	1090	1095	
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cgt ggc acc ccg tgg	3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp	
1100	1105	1110	
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc	3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala	
1115	1120	1125	
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct	3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro	
1130	1135	1140	
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag	3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys	
1145	1150	1155	
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga	3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg	
1160	1165	1170	
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca	3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala	
1175	1180	1185	
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg	3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val	
1190	1195	1200	
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c		3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro		
1205			

<210> 4  
 <211> 1206  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg

1	5	10	15
Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val	20	25	30
Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala	35	40	45
Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys	50	55	60
Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys	65	70	75
Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser	85	90	95
Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr	100	105	110
Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val	115	120	125
Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp	130	135	140
Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe	145	150	155
Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu	165	170	175
Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly	180	185	190
Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp	195	200	205
Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser	210	215	220
Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser	225	230	235
			240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly  
245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg  
260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser  
275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr  
290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly  
305 310 315 320

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg  
325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val  
340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu  
355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg  
370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln  
385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu  
405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr  
420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe  
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
450 455 460



Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg  
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr  
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp  
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu  
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu  
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr  
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln  
580 585 590

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn  
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys  
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp  
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile  
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp  
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val  
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu  
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His  
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser  
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp  
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu  
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu  
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val  
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn  
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr  
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu  
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln  
850 855 860

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser  
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr  
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly  
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly

915

920

925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr  
 930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val  
 945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro  
 965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val  
 980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met  
 995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met  
 1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser  
 1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val  
 1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu  
 1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp  
 1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly  
 1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser  
 1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn  
 1115 1120 1125

Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly  
 1130 1135 1140

• • ()

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser  
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala  
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg  
1190 1195 1200

Pro Gln Pro  
1205

<210> 5  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana, Oryza sativa

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg  
1 5 10